

Synthèse

**Genotypic and phenotypic variability,
individual susceptibility factors and industrial
genotoxicants/neurotoxicants in occupational medicine**

VUB- M. Kirsch-Volders (coordinateur)

KUL- H. Veulemans

RUG- H. Thierens

RUG- L. de Ridder

UCL- D. Lison

UCL- P. Vielle

ULg- C. Laurent

**Prof. Dr. KIRSCH-VOLDERS M. –
Coordinator**

Vrije Universiteit Brussel (VUB)
Laboratorium voor Cellulaire Genetica
Pleinlaan 2
1050 Brussel
tel: 02/629.34.23.
fax: 02/629.34.08.
E-mail: mkirschv@vub.ac.be

Prof. Dr. VEULEMANS H.

Katholieke Universiteit Leuven (KUL)
Laboratorium voor Arbeidshygiëne en
Toxicologie
Kapucijnenvoer 35
3000 Leuven
tel: 016/33.69.95.
fax: 016/33.69.97.
E-mail :
Hendrik.Veulemans@med.kuleuven.ac.be

Prof. Dr. DE RIDDER L.

Universiteit Gent (RUG2)
Vakgroep Anatomie, embryologie en
histologie en medische fysica
Louis Pasteurlaan 2
9000 Gent
tel: 09/264 92 41
fax: 09/264 94 98
E-mail: leo.deridder@rug.ac.be

Prof. Dr. THIERENS H.

Universiteit Gent (RUG1)
Faculteit Geneeskunde
Vakgroep Anatomie, embryologie en
histologie en medische fysica
Proeftuinstraat 86
9000 Gent
tel: 09/264 66 43
fax: 09/264 66 99
E-mail: hubert.thierens@rug.ac.be

Prof. Dr. LISON D.

Université Catholique de Louvain (UCL)
Unité de Toxicologie Industrielle et Médecine
du Travail
Clos Chapelle aux Champs 30.54
1200 Bruxelles
tel: 02/764.32.20.
E-mail : lison@toxi.ucl.ac.be

Prof. Dr. VIELLE P.

Université catholique de Louvain (UCL)
Département de Droit Economique et Social
Collège Thomas More
Place Montesquieu 2
1348 Louvain-la-Neuve
tel: 010/47 47 60 (58)
fax: 010/47 47 57
E-mail: vielle@deso.ucl.ac.be

Dr. LAURENT Ch.

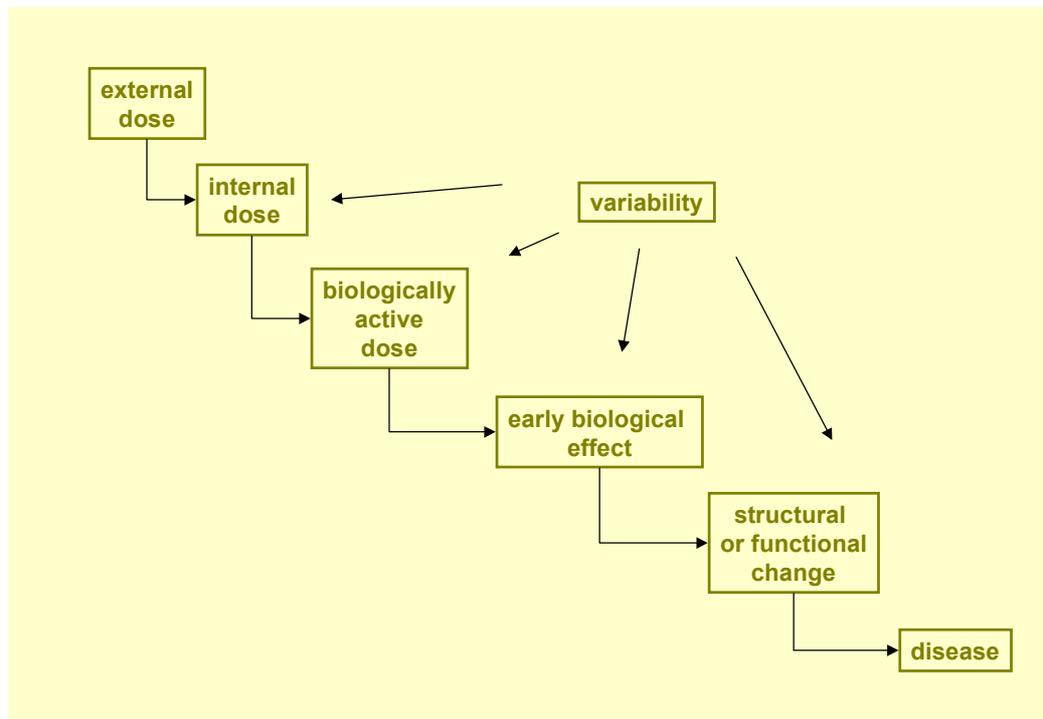
Université de Liège (ULg)
Laboratoire d'Oncologie, Radiobiologie et
Mutagenèse Expérimentale
Tour de Pathologie 1, CHU B23
4000 Liège
tel: 04 / 366.24.47. - 04 / 366.25.33.
fax: 04 / 366.24.33.
E-mail : chr.laurent@ulg.ac.be

Mots-clés

Monitoring biologique professionnel, mutagènes/opioïdes, génotype, phénotype, susceptibilité inter-individuelle.

Introduction

Les programmes de surveillance médicale des travailleurs potentiellement exposés à des substances chimiques dangereuses dans le cadre de leur travail sont basés sur le schéma ci-dessous, qui résume la séquence d'événements reliant l'exposition aux toxiques à l'expression de la maladie (maladie professionnelle).



Trois approches complémentaires sont généralement distinguées : (1) le monitoring d'exposition basé sur l'utilisation de paramètres reflétant la dose externe, la dose interne, la dose biologiquement active ou parfois des effets précoces réversibles, (2) le monitoring des effets qui explore les réponses de l'organisme à l'exposition chimique, et (3) le monitoring de susceptibilité dont le but est de prendre en compte la variabilité inter-individuelle dans le métabolisme des xénobiotiques et dans la réponse de l'organisme. Ce dernier aspect n'est toutefois que rarement pris en compte en médecine du travail, du fait de l'absence de biomarqueurs validés, et du fait qu'il n'existe pas de consensus quant à l'acceptabilité de cette approche.

Durant les dernières années, le séquençage du génome humain et l'introduction de techniques de biologie moléculaire ont contribué à d'énormes progrès dans la plupart des disciplines biomédicales, et ont en particulier permis le développement de nouveaux biomarqueurs de susceptibilité (enzymes de biotransformation, gènes de contrôle du cycle cellulaire, enzymes de réparation de l'ADN, gènes de la réponse immunitaire, ...). Cette perspective est cependant

une importante cause d'inquiétude, en particulier parce qu'elle pourrait mener à l'exclusion du marché du travail des plus susceptibles, des plus faibles. Cette problématique est le sujet d'un débat éthique intense en Europe et aux Etats-Unis, parfois avec des vues très divergentes. En Belgique, lorsque ce programme de recherche a débuté, le débat n'était pas très structuré et, eu égard aux développements rapides attendus, il a été jugé dangereux d'ignorer ces questions trop longtemps. Les tests de susceptibilité individuelle devraient-ils être interdits en médecine du travail ? Leur mise en œuvre devrait-elle être contrôlée ? Comment ? Quel pourrait être le bénéfice de ces tests ?

Cependant, avant de discuter les aspects éthiques de cette problématique, il a paru nécessaire d'aborder les questions suivantes :

- 1. Sommes-nous CAPABLES d'examiner les facteurs de susceptibilité ? Les outils diagnostiques sont-ils suffisamment fiables et robustes pour être utilisés sur une large échelle ? Des tests pour identifier le génotype ou le phénotype sont-ils disponibles en Belgique ?*
- 2. Est-il potentiellement UTILE de mettre ces tests en œuvre ? Pourvu que les aspects techniques soient suffisamment maîtrisés, quelle est la valeur prédictive de ces tests ? Quelle en est la précision, l'exactitude ? Dans quel contexte ce type d'information pourrait-il être utile ?*

Il fut considéré qu'il n'était envisageable de discuter les implications sociétales et éthiques du biomonitoring de susceptibilité qu'une fois que ces questions auraient reçu une réponse claire, basée sur des arguments scientifiques solides.

- 3. Si ces tests sont potentiellement utiles, sont-ils APPLICABLES en médecine du travail ?*

Lorsque cette recherche scientifique fut initiée, nous avons souligné que la responsabilité des scientifiques était de fournir les éléments nécessaires pour nourrir une réflexion sereine et bien documentée. Nous souhaitons mettre en avant l'idée qu'il était inapproprié de discuter les implications éthiques d'un test qui n'était pas disponible ou dont la valeur prédictive n'était pas démontrée.

Résultats

La stratégie du programme de recherche est basée sur **l'intégration de nouveaux biomarqueurs et l'interaction entre la recherche appliquée et fondamentale**. Cette stratégie comprend en parallèle, l'identification de nouveaux biomarqueurs de susceptibilité. Les aspects sociétaux constituent un volet important du programme, avec en particulier une attention pour les aspects juridiques.

Aspects scientifiques :

L'étroite interaction et l'interdisciplinarité des équipes engagées dans ce programme ont permis une approche intégrée de l'évaluation de l'exposition, des biomarqueurs d'effet et de susceptibilité dans le cadre d'expositions professionnelles à des cancérogènes génotoxiques et aux analgésiques opioïdes. La fertilisation réciproque entre les laboratoires a constitué un important facteur de stimulation.

Dans un premier temps, les équipes ont décidé ensemble des méthodologies à développer et valider, des populations à étudier, de la préparation des questionnaires, de l'organisation des prélèvements et de la coordination des groupes. L'avis du comité de suivi a été sollicité. Dans un second temps, les différentes études expérimentales ont été réalisées dans les laboratoires, séparément ou en étroite collaboration (RUG/VUB, UCL/VUB, UCL/KUL/VUB). L'étape finale a consisté en une analyse statistique intégrée de la combinaison des résultats générés par les différents laboratoires, pour s'intéresser aux facteurs de susceptibilité dans une situation professionnelle donnée.

L'étude en collaboration (**KUL/UCL/VUB**) de la **susceptibilité au styrène** a combiné une très large gamme de biomarqueurs. Un effort particulier a été consenti pour réaliser une quantification exacte et sensible des adduits de styrène ainsi qu'un génotypage et un phénotypage des différents gènes. Les résultats indiquent que des mutations chromosomiques/génomiques sont formées chez les travailleurs exposés à de faibles concentrations de styrène. La durée d'exposition, l'âge et les habitudes tabagiques sont d'importants déterminants à considérer dans les études de génotoxicité en milieu professionnel. Le génotypage des enzymes de biotransformation et de réparation de l'ADN est utile pour évaluer de manière plus individualisée les risques génotoxiques d'une exposition au styrène. Le phénotype de réparation *in vitro* des cassures simples brins constitue une méthode valable pour estimer la capacité de réparation des travailleurs.

En ce qui concerne l'exposition aux **poussières de cobalt (VUB/UCL)**, ses effets mutagènes induits par les dommages oxydatifs ont été démontrés *in vitro* sur les lymphocytes humains et *in vivo* chez le rat. L'évaluation du potentiel cancérigène a été complétée par des études d'induction d'apoptose et d'inhibition de la réparation. Une étude en milieu professionnel a été réalisée chez des travailleurs exposés au cobalt seul ou aux métaux durs (WC-Co). Aucune augmentation significative des effets génotoxiques ne fut détectée parmi ces travailleurs exposés en moyenne à la TLV-TWA (20 µg/m³). Cependant, une analyse de régression multivariée a indiqué que les travailleurs fumeurs qui étaient exposés au WC-Co excrétaient plus de 8-OHdG et présentaient des taux accrus de micronoyaux. Il fut conclu que ce groupe de travailleurs devait faire l'objet d'une surveillance particulière. Dans ces mêmes populations de travailleurs ainsi que chez leurs contrôles, la susceptibilité génétique a été examinée en évaluant la capacité individuelle d'éliminer les lésions oxydatives et de réparer les cassures de l'ADN. Ces résultats indiquent que les polymorphismes des gènes qui codent pour les enzymes de réparation des bases oxydées (8-OHdG), des cassures simples brins (XRCC1) et doubles brins (XRCC3) sont impliqués dans la variation de l'amplitude des effets génotoxiques observés chez ces travailleurs. L'interaction entre ces polymorphismes semble critique et un génotypage unique ne peut pas être recommandé. En outre, comme souligné dans notre étude antérieure, l'interaction avec les habitudes tabagiques est un déterminant critique, ce qui n'est pas surprenant vu que le tabagisme en soi induit des dommages oxydatifs.

Une étude prospective historique a examiné la valeur prédictive du polymorphisme HLA-DPB1 Glu69 en termes de maladie parenchymateuse pulmonaire en étudiant les paramètres de fonction pulmonaire parmi les travailleurs d'une usine de raffinage de cobalt qui avaient été inclus dans un programme de biomonitoring entre 1988 et 2001. 122 travailleurs masculins ayant un minimum de trois tests de fonction pulmonaire (VEMS, CVF) durant la période de suivi furent examinés. Le résultat principal est que l'exposition au cobalt contribue au déclin au cours du temps du VEMS, pas de la CVF, chez les fumeurs exclusivement. Aucune influence de Glu69 ne fut détectée. Bien que l'amplitude de la réduction additionnelle associée à l'exposition était relativement faible (<20%) comparativement au déclin attendu

chez les fumeurs, les résultats indiquent que des efforts supplémentaires doivent être poursuivis pour réduire l'exposition et encourager les travailleurs à cesser de fumer.

Les résultats obtenus par la collaboration entre UCL et VUB contribuent de manière significative à la **compréhension des mécanismes de cancérogenèse** induits par le cobalt, et rendent également possible, dans le futur, une approche scientifique pertinente de la **susceptibilité individuelle** dans ce type d'exposition professionnelle. Leur expertise complémentaire (toxicologie industrielle et génotoxicité) a mené à une invitation à rédiger ensemble trois papiers de revue (Lison et al., 2000; Kirsch-Volders et al., 2002; De Boeck et al., 2003), à donner plusieurs exposés en Belgique et à l'étranger portant sur l'évaluation de la génotoxicité liée à une exposition professionnelle, ainsi que de participer au groupe de travail IARC pour l'évaluation des poussières contenant du cobalt (2003).

Pour la partie qui concerne les radiations ionisantes (**RUG/VUB/ULg**), les études ont investigué la relation entre la radiosensibilité chromosomique accrue, observée chez un certain nombre d'individus (patients, travailleurs) et l'expression des gènes engagés dans les processus de maintenance de l'ADN. Ces observations doivent être considérées comme la première étape du processus de compréhension des **mécanismes moléculaires** sous-tendant la radiosensibilité. La détection des mutations, des polymorphismes dans les gènes de maintenance l'ADN parmi des individus ayant une radiosensibilité chromosomique accrue *in vivo* ou *in vitro* est une question très importante pour le futur dans le cadre de la **susceptibilité** des travailleurs aux radiations. Bien que les présentes études aient montré que les tests de radiosensibilité des chromosomes sont fiables pour réaliser des études dans des populations, une optimisation est encore nécessaire pour en accroître la valeur pour une évaluation individuelle. Des examens multiples sont susceptibles d'améliorer la spécificité des tests.

Le génotypage des certains gènes de réparation de l'ADN et le phénotypage pour la réparation des cassures de type simple brin ont été réalisés parmi des travailleurs de l'industrie nucléaire. Sur la base des résultats, il n'est pas possible de sélectionner un génotype unique pour prédire la susceptibilité individuelle aux radiations ionisantes. Une combinaison de trois génotypes, les polymorphismes hOGG1, XRCC1 et XRCC3, est recommandée. Comme alternative ou complément, le phénotype de réparation *in vitro* des cassures simple brins, qui intègre différents mécanismes est recommandé.

L'étude de l'exposition professionnelle aux **opioïdes dans l'industrie pharmaceutique (KUL)** est la première du genre et le développement de méthodologies analytiques adéquates a été réalisé avec succès. Pour l'évaluation de l'exposition par voie inhalatoire, des techniques d'échantillonnage et une stratégie sont disponibles en routine. Pour ce qui concerne l'exposition cutanée, de telles méthodes ne sont pas disponibles et une standardisation est essentielle. Ainsi, un protocole exploratoire fut développé pour apprécier l'exposition cutanée et mis en œuvre avec succès. La distribution spatiale de la contamination du corps entier au fentanyl a été mesurée grâce à l'application de patches cutanés appliqués en différentes localisations anatomiques. En outre, un protocole simple d'essuyage des mains s'est révélé un paramètre adéquat pour estimer l'exposition corps entier. Pour évaluer l'exposition interne, des biomarqueurs spécifiques comme la concentration urinaire de fentanyl ou de ses métabolites peuvent être utilisées. Ces biomarqueurs étaient intimement corrélés à l'exposition cutanée du corps entier, alors que la corrélation était moins bonne avec l'exposition inhalatoire. L'importance des différentes voies d'exposition a été explorée et il fut conclu que l'exposition cutanée constituait la voie principale d'exposition. Dans ces circonstances, une évaluation intégrée de l'exposition et de l'absorption individuelle de

l'opioïde grâce au biomonitoring constitue une stratégie essentielle. Cependant, le métabolisme du fentanyl et son élimination peuvent être sujets à des variations inter-individuelles et la sélection d'un biomarqueur approprié pourrait permettre d'obtenir des informations complémentaires à propos de la susceptibilité individuelle des travailleurs. Cette étude pourra servir à l'avenir de **modèle** pour l'évaluation de l'exposition professionnelle des travailleurs et de la susceptibilité individuelle pour d'autres produits pharmaceutiques possédant les mêmes propriétés.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce programme de recherche sont impressionnants. Leur qualité scientifique est attestée par les nombreuses publications conjointes dans des revues internationales. Elles couvrent la majorité des questions qui étaient posées au début du programme. Les méthodologies sont maintenant **disponibles** pour déterminer les génotypes des enzymes de biotransformation et de réparation de l'ADN et pour phénotyper des fonctions cellulaires spécifiques. Ces méthodes ont prouvé leur **utilité** scientifique en contribuant à affiner l'exactitude des biomarqueurs d'exposition ou d'effet. **L'applicabilité** en a été évaluée par une approche éthico-juridique.

Aspects juridiques :

Grâce à son inter-disciplinarité, le projet a permis une meilleure compréhension des objectifs et des limites des autres disciplines impliquées.

Outre l'échange mutuel d'information, le caractère intégré de l'inter-disciplinarité au sein du réseau a permis un réel échange d'opinions et une véritable confrontation des idées entre les disciplines, et même au sein d'elles.

Une meilleure compréhension des **enjeux juridiques** en rapport avec la question de l'utilisation de tests génétiques dans le cadre des relations d'emploi a été obtenue. Ces enjeux ont ensuite été analysés dans le cadre plus large de la **prévention** et/ou de **l'indemnisation** des maladies professionnelles. Les faiblesses et points forts de notre système ont ainsi pu être mis en lumière.

Conclusion

Différentes méthodologies de génotypage et de phénotypage ont été validées par les équipes collaborant au projet, dans le but de permettre une prévention adéquate des expositions professionnelles. Les laboratoires ont démontré leur spécificité pour détecter les variations inter-individuelles pour le métabolisme des agents chimiques et physiques et la réparation des lésions à l'ADN. Ils en ont évalué la réponse dans différents types d'industries, mais la compréhension complète de la relation entre le génotype et le phénotype requerra encore des études supplémentaires. Les résultats actuels doivent donc être considérés avec prudence. Les tests de génotypage et de phénotypage ont encore une validité incertaine du fait des populations limitées et potentiellement biaisées qui ont jusqu'ici été étudiées, de la faible pénétrance et de l'expressivité variable des génotypes, d'une considération incomplète des modificateurs du phénotype ou de la mise en œuvre de paramètres cliniques ambigus pour mesurer les effets. Pour les gènes variants associés avec des maladies communes, une faible prédictivité est attendue car de multiples autres facteurs génétiques et non-génétiques

contribuent également à l'expression clinique. L'intérêt clinique d'un test dépend également de la disponibilité, de la sécurité et de l'effectivité des mesures préventives ou thérapeutiques qui peuvent être offertes aux individus présentant un test positif. Leur application sera conseillée seulement à titre de complément d'information pour la surveillance médicale normale et pas pour une sélection des travailleurs.

Les aspects scientifiques et juridiques ont souligné tous deux la force de l'interdisciplinarité. Ceci fut réellement essentiel pour la réalisation et la qualité du programme. De manière encore plus importante, **l'interaction entre les aspects scientifiques et juridiques a apporté une valeur ajoutée indéniable qui a permis de passer d'une bonne question scientifique à une démarche essentielle pour une science responsable.**